

München, 1960.

Versuche zur
Papierchromatographie
freier Fettsäuren

Klaus Vogelgsang



AUS DER
MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

**Versuche zur
Papierchromatographie
freier Fettsäuren**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Klaus Vogelgsang
aus Ulm-Söflingen

München 1960

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Dozent Dr. N. ZÖLLNER
Correferent:	Professor Dr. W. SEITZ
Dekan:	Professor Dr. H. SCHWIEGK

Tag der mündlichen Prüfung: 5. IV. 1960

MEINEM VATER UND GROSSVATER,

den Praktikern Dr. med. Werner und Dr. med. Otto Vogelsang



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555220_0085

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	7
Verschiedene Methoden der papierchromatographischen Auftrennung von Fettsäuren	8
1. Versuche zur Auftrennung ohne Vorbehandlung der Fettsäuren oder des Papiers	8
2. Versuche zur Auftrennung nach Vorbehandlung der Fettsäuren	8
3. Versuche zur Auftrennung nach Vorbehandlung des Papiers	9
EIGENE VERSUCHE	12
Methode	12
Versuche zur Methodik	13
Versuche mit reinen Substanzen	14
Versuche mit tierischen Fettextrakten	17
Versuche zur Auswertung	18
1. Nachweis durch Autoradiographie	18
2. Nachweis durch einen Radiopapierchromatographen	18
3. Nachweis im Methandurchflusszähler	19
DISKUSSION	20
LITERATURVERZEICHNIS	22

EINLEITUNG

Seit der Einführung der Papierchromatographie haben verschiedene Autoren versucht, diese Methode auch für die Auftrennung von Fettsäuren zu verwenden. Die zahlreichen Veröffentlichungen lassen erkennen, dass zwar auf Einzelgebieten gute Ergebnisse erzielt wurden, dass aber eine umfassende Methode für Fettsäuren von C_4 - C_{20} noch nicht entwickelt werden konnte.

Bei unseren im Jahre 1957 angestellten Versuchen handelt es sich darum, eine für Reihenuntersuchungen brauchbare Methode der Auftrennung und Auswertung von höheren Fettsäuren zu finden. Es sollte damit die Möglichkeit geschaffen werden, den Fettstoffwechsel von Tieren (Ratten, Tauben), denen vorher aktives Tripalmitin zugeführt wurde, zu untersuchen. Es mussten deshalb an das Chromatogramm bestimmte Anforderungen gestellt werden:

- a) Eine einfache und sicher zu handhabende Methodik zu entwickeln, da bei den einzelnen Organen (Herz, Lunge, Muskel) so wenig Untersuchungsmaterial anfällt, dass sich die Versuche nicht beliebig oft wiederholen lassen.
- b) Eine einwandfreie und saubere Trennung der einzelnen Säuren zu finden, wobei die Flecke des Chromatogramms eine gewisse Grösse nicht überschreiten sollten. Diese Forderungen waren nötig, da sich die Streifen des Chromatogramms weder durch Autoradiographie, noch durch einen Radiopapierchromatographen auswerten liessen. Die Flecke mussten deshalb ausgeschnitten und im Methan-durchflusszählrohr einzeln ausgemessen werden. Diese Methode verlangte aber eine deutliche, saubere Trennung; es durften weder Überschneidungen, noch Schwanzbildungen auftreten; ausserdem sollten die Flecke so klein bleiben, dass wir sie für den Auszählvorgang nicht teilen mussten.

VERSCHIEDENE METHODEN DER PAPIERCHROMATOGRAPHISCHEN AUFTRENNUNG VON FETTSÄUREN.

Im Laufe der letzten Jahre haben verschiedene Gruppen einige brauchbare Methoden für die papierchromatographische Auftrennung von Fettsäuren entwickelt. Man kann die Arbeiten über diesen Komplex grob in drei verschiedene Versuchsrichtungen einteilen.

1. Versuche zur Auftrennung ohne Vorbehandlung der Fettsäuren oder des Papiers:

Hier hatten mehrere Autoren in der Auftrennung der niederen Fettsäuren bis etwa C_8 Erfolg. Sie benutzten für die Entwicklung ammoniakalische Wasser-Alkohol-Gemische (1, 2, 3, 4). Aus den angegebenen R_f -Werten (3) ist jedoch ersichtlich, dass bei zunehmender Kettenlänge der Abstand zwischen den einzelnen Säuren immer geringer wird und deshalb bei Fettsäuren über C_8 eine Auftrennung praktisch nicht mehr stattfindet (4). KAUFMANN und BUDWIG (5) geben eine Methode an, die auch bei höheren Fettsäuren eine Trennung ermöglichen soll. Sie untersuchten die Wanderungstendenz der einzelnen Säuren in Wasser-Methanol-Gemischen verschiedener Konzentration und konnten dadurch geeignete Entwicklungslösungen für verschiedene Fettsäurepaare herstellen. Für die Trennung von mehr als zwei Komponenten benutzten sie die Methode einer fraktionierten Entwicklung, d. h. sie änderten während des Arbeitsvorgangs die Konzentration des Entwicklungsgemisches. Diese Methode hat zwar den Vorteil einer kurzen Entwicklungszeit, ist aber wenig tauglich, da mit ihr die Trennung mehrerer Fettsäuren in einem Arbeitsgang nicht durchgeführt werden kann.

2. Versuche zur Auftrennung nach Vorbehandlung der Fettsäuren:

Es sind hierzu eine ganze Reihe von Möglichkeiten in der Literatur beschrieben worden. K. SATAKE und T. SEKI (6) arbeiteten mit Hydrazonen und benutzten ein Entwicklungsgemisch aus Isoamylalkohol-Collidin-Wasser. Die Flecke werden mit ammoniakalischen Silbernitrat sichtbar gemacht.

Als Natriumsalze hat F. BROWN (7) die Säuren bis C_6 getrennt. Er gebraucht mit 1,5 n Ammoniak gesättigtes Butanol als Entwicklungsmittel. BROWN versuchte auch die Trennung der Kalisalze der Fettsäuren.

HISCOX und BERIDGE (2) trennten die Ammoniumsalze in Butanol, das mit 1 n Ammoniak gesättigt wurde. Von C_8 ab werden die Unterschiede der R_f -Werte jedoch gering.

Y. INOUE und M. NODA (8) gelang es, die Hydroxamsäure-Derivate der Fettsäuren bis zur Caprinsäure aufzutrennen. Die Verfasser betonen aber, dass ihre Methode weniger tauglich für die Trennung höherer Fettsäuren ist.

Bessere Ergebnisse zeigten Versuche mit Hydroxamaten auf vorbehandeltem Papier. F. MICHEL und H. SCHWEPPE (9) trennten die Kalisalze der Hydroxamsäuren auf Cellulose-Acetat-Papier mit einem Acetylgehalt von 22% - 26%. Zum Entwickeln verwendeten sie ein Essigsäureaethylester-Tetrahydrofuran-Wasser-Gemisch, zum Anfärben sprühten sie in Aethanol/Butanol gelöstes 2% Eisen-III-chlorid auf das Papier. Ihre angegebenen R_f -Werte lassen eine gute Auftrennung erwarten; aus den beigegebenen Abbildungen ist jedoch ersichtlich, dass vor allem bei den höheren Fettsäuren eine leichte Überlagerung und zum Teil auch Schwanzbildung auftritt.

3. Versuche zur Auftrennung durch Vorbehandlung des Papiers:

Man will auf diese Weise die stationäre Phase der Chromatographie für die nicht wasserlöslichen Fettsäuren lipophil machen. Hierzu bieten sich zwei Wege an: Entweder man verändert die Oberfläche des Papiers durch chemische Behandlung derart, dass oberflächliche hydrophobe Cellulose-Derivate entstehen, oder man überzieht das Papier mit einer hydrophoben indifferenten Substanz, bzw. man tränkt es mit geeigneten organischen Lösungsmitteln.

Th. WIELAND und A. BERG (10) behandelten das Papier mit Distickstofftetroxyd, wodurch die Cellulose an C_6 zur Uronsäure oxydiert wurde. Auch die Herstellung acetylierten Papiers gehört in diese erstere Gruppe (9).

Als einfachere und gebräuchlichere Methode hat sich das Durchtränken des Papiers mit organischen Lösungsmitteln-Imprägnierungsmitteln durchgesetzt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das Entwicklungsgemisch immer mit der Imprägnierungssubstanz gesättigt wird.

D. KRITCHEVSKY und A. TISELIUS (11) tränkten das Papier mit Silikonen und setzten es anschliessend Chloroformdämpfen aus. Als Entwicklungsgemisch-Lösungsmittel diente ihnen ein Wasser-Aethanol-Chloroformgemisch.

J. BOLDINGH (12) verwandte Latex als Imprägnierungsmittel bei der Trennung von Fettsäureaethylestern. Als Lösungsmittel werden Methanol oder Methanol-Aceton-Gemische angegeben; zur Anfärbung wird Sudan IV benutzt. G. NUNEZ (13) imprägnierte das Papier mit Triolein, das er in Benzol gelöst auf das Papier sprüht. Für die von ihm aufgetrennten Fetthydrolysate verwendet er 80% Aethanol als Lösungsmittel.

WEGMANN und Mitarbeiter (14) imprägnierten ihr Papier mit Paraffin. Sie lösten

Paraffinöl in Benzol, tauchten das Papier ganz ein, pressten es zwischen Filterpapier aus und trockneten es flach liegend. Als Lösungsmittel benutzten sie 60%-90% Methyl- und 80% - 90% Äthylalkohol. Zur Sichtbarmachung wandelten sie die Fettsäuren in ihre Silberseifen um, die dann durch verdünntes Ammoniumsulfid in schwarzbraunes Silbersulfid übergeführt wurden. Die Abbildungen über diese Methode lassen jedoch bei den höheren Fettsäuren nur ungenügende Ergebnisse erkennen.

J. SPITERI (15) führte die Imprägnierung mit Paraffin noch einen Schritt weiter. Er fand bei Durchtränkung des Papiers auf demselben Chromatogramm leicht abweichende Rf-Werte für die gleiche Fettsäure. Daraus schloss er, dass die Imprägnierung nicht gleichmässig genug sei. Eine möglichst homogene Imprägnierung glaubte er mit Hilfe der Eigenkapillarität des Papiers zu erreichen, d.h. er lässt das Papier sich vollsaugen. Das Imprägnierungsmittel blieb dasselbe, in Benzol gelöstes Paraffinöl. Im Gegensatz zu WEGMANN (14) verwendete er Eisessig als Lösungsmittel. Seine Rf-Werte für Palmitin- und Stearinsäure schwanken bei der ersten Imprägnierungsmethode um rund 0,10 - 0,13, die beigelegte Abbildung zeigt eine nur undeutliche Abgrenzung der Flecke gegeneinander. Bei seiner eigenen Methode sind die Schwankungen der Rf-Werte sehr gering, sie bewegen sich zwischen 0,01 - 0,03; über die Abgrenzung der Flecke wird nichts ausgesagt.

A. HOLASEK und K. WINSAUER (16) versuchten eine Imprägnierung mit Metallhydroxyden. Die günstigsten Resultate erzielten sie durch die Vorbehandlung des Papiers mit einer Alaunlösung. Zur Entwicklung benützten sie ein Gemisch aus Tetrachlorkohlenstoff-Methanol-Wasser; zur Anfärbung verwendeten sie eine 0,1% Rhodamin-B Lösung. Die Auftrennung gelingt gut und zeigt deutlich gegeneinander abgegrenzte Flecke bis etwa C₁₄. Stearin- und Palmitinsäure sind nur undeutlich aufgetrennt. An der Lösungsmittelfront erscheint ausserdem ein breiter fluoreszierender Streifen, dessen Herkunft von den Autoren nicht geklärt wurde.

H. KAUFMANN und W. NITSCH (17) verwendeten für die Imprägnierung hochsiedende Kohlenwasserstoffe (KW) und als Lösungsmittel Alkohol-Wasser- und Eisessig-Wasser-Gemische. Bei der Prüfung der Petrolfraktion fanden sie als günstigste Imprägnierungssubstanz die Fraktion zwischen 190° - 220°C. Die niedriger siedenden Kohlenwasserstoffe sind sehr temperaturempfindlich wegen ihres relativ hohen Dampfdrucks und daher ungeeignet. Die sehr hoch siedenden Kohlenwasserstoffe lassen sich nach der Auftrennung nur schwer vom Papier trennen und stören somit bei der Anfärbung der Chromatogramme. Bei der Verwendung von Alkohol-Wasser-Gemischen konnten nur mit Isopropylalkohol günstige Ergebnisse erzielt werden. Die Nachteile dieses Systems waren seine grosse Temperaturabhängigkeit in Bezug auf die Sättigung des Lösungsmittels mit KW, die relativ schnelle Abnahme der Wanderungsgeschwindigkeit der Lösungsmittelfront, nach ca. 18 cm keine Fortschritte mehr, und die hohen Schwankungen der Rf-Werte. Bei ihren Versuchen

mit Eisessig-Wasser-Gemischen gelang ihnen eine gute und ausreichende Trennung vor allem der höheren Fettsäuren. Die Vorzüge gegenüber dem Alkohol-Wasser-Gemisch waren die geringere Temperaturabhängigkeit und die viel höhere Wandergeschwindigkeit. Die Schwankungen der Rf-Werte betrugen nicht mehr als 10% bei genauer Versuchsausführung.

Aus Rf-Werten und Abbildungen dieser Arbeit ist gerade die gute Auftrennung der höheren Fettsäuren ersichtlich, die bis jetzt bei den anderen Autoren nur unzureichend gelang. Mit steigender Kettenlänge wird die Fleckform konzentrierter bei deutlicher Abgrenzung gegeneinander; bei sinkender Kettenlänge, die grössere Löslichkeit in Eisessig bedeutet, nehmen die Flecken an Fläche zu und werden in der Begrenzung unscharf. Da gerade Palmitin- und Stearinsäure mit Rhodamin-B nur schlecht nachzuweisen sind, wird das Chromatogramm unter Verwendung von Kupferacetat und Kaliumferrocyanid angefärbt.

Ausgehend von dieser Methode haben H. WAGNER, C. ABISCH und K. BERNHARD (18) Fettsäuren von C₁₂ - C₂₂ aufgetrennt und darüber hinaus eine Methode zur quantitativen Auswertung des Chromatogramms durch die Messung der Lichtabsorption mittels eines geeigneten Kolorimeters beschrieben.

EIGENE VERSUCHE

METHODE.

Bei der Ausarbeitung einer eigenen Versuchsanordnung beschäftigten wir uns zunächst mit der Methode von J. SPITERI (15). Die Imprägnierungsversuche mittels Aufsprühen ergaben bei uns meist eine ungleichmässige Verteilung des Imprägnierungsmittels auf dem Papier, während wir von der Imprägnierung durch die Kapillarkräfte des Papiers eine gleichmässige Verteilung erwarteten.

Bei den zuerst angestellten Versuchen mit in Benzol gelöstem Paraffinöl war die Wanderungsgeschwindigkeit der Front der Imprägnierungslösung auch in geschlossenen Gefässen völlig ungenügend und erreichte selbst nach Tagen keine für die Versuchsbedingungen ausreichende Höhe auf dem Papierstreifen. Nach diesem Misserfolg verwendeten wir die von KAUFMANN (17) angegebenen hochsiedenden Kohlenwasserstoffe = KW. Wir destillierten handelsübliches Petroleum und haben die bei 190° - 220°C übergehende Fraktion aufgefangen. Das so gewonnene Imprägnierungsmittel wird in ein verschliessbares Gefäss gegeben, in das Papierstreifen eingehängt werden. Schon nach wenigen Stunden wurde im abgeschlossenen Gefäss eine für die Chromatographie ausreichende Höhe der Imprägnierung erreicht. Ausserhalb eines geschlossenen Gefässes gelingt dies nicht, da die KW zu leicht und zu schnell vom Papier verdunsten. Um gleiche Bedingungen zu erhalten, liessen wir die Papierstreifen sich ganz vollsaugen. Sie wurden dann herausgenommen und bei Zimmertemperatur (20° - 23°C) zwischen 3-8 Stunden über einer Leine getrocknet.

Als Chromatographiegefässe benutzten wir Glaszylinder von 20 x 20 x 50 cm, in die bis zu vier Streifen eingehängt werden konnten. Zur Abdichtung wurde auf den Rand der Gefässe ein breiter Schaumgummistreifen geklebt, darauf kam eine beschwerte Glasplatte. Die Chromatographiestreifen wurden gefalzt und über Glasstäbe gehängt, die mittels Gummistopfen in die Gefässe eingespannt wurden.

Wir verwendeten für unsere Vorversuche reine Myristin-, Palmitin-, Öl- und Stearinsäure. Sie wurden als 0,5 - 2% benzolische Lösungen aufgetragen, und zwar in Mengen von 50-100 Gamma. Das aus den obengenannten Fettsäuren bestehende Gemisch wurde dementsprechend als 2-6% benzolische Lösung auf das Papier gebracht.

Als Chromatographiepapier nahmen wir das dem Whatman No. I identische Schleicher und Schüll 2043 b mgl. Das Papier wurde in Streifen von 50 cm Länge und 15 cm Breite geschnitten. Die Startlinie wurde 3 cm vom Unterrand entfernt eingezeichnet, die Startpunkte selbst lagen mindestens 2,5 cm auseinander. Der Durchmesser der aufgetragenen Fettsäureflecke schwankte zwischen 0,8 cm und 1,2 cm.

Als Lösungsmittel gebrauchten wir die offizinelle konzentrierte Essigsäure (96-97%) ohne weitere Reinigung. Die Essigsäure wurde zuerst mit KW gesättigt. Im Schüttelkolben wurden 500 ml Essigsäure mit 25 ml KW 15 Minuten lang gemischt und anschliessend eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen; danach wurde noch einmal 15 Minuten geschüttelt und dann nach völliger Schichtentrennung die gesättigte Essigsäure in das Chromatographiegefäss gegeben. Zur geringfügigen Unterschreitung der Sättigung wurden noch 10 ml Essigsäure beigegeben, um eine Entmischung des Lösungsmittels zu vermeiden, die schon bei kleineren Temperaturschwankungen eintreten kann. Die Laufzeit betrug bei uns zwischen 16 und 25 Stunden, wobei Temperaturunterschiede von 4° - 6°C hingenommen werden mussten.

Bei der Anfärbung der Chromatogramme gingen wir nach der bei WAGNER und ABISCH (18) beschriebenen Methode vor. Die Papierstreifen wurden sofort nach der Entnahme aus den Gefässen im Trockenschrank 90 Minuten lang bei 80°C getrocknet. Dann wurden die Streifen in ein Bad gebracht, das pro 1000 ml Wasser 20 ml gesättigte Kupferacetatlösung enthielt. Nach 15 Minuten wurden sie dem Bad entnommen, in leicht fliessendem Wasser 10 Minuten lang gespült und anschliessend kurz in 1,5% Kaliumferrocyanidlösung getaucht. Die Fettsäureflecken erschienen auf dem Papier als braunrote Kupfercyanidkomplexe; überschüssiges $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ wird mit Leitungswasser ausgewaschen. Da besonders die nur schwach angefärbten Flecke nach längerer Zeit verblassen, haben wir nach dem Trocknen alle Flecke in Umrisszeichnungen festgehalten.

VERSUCHE ZUR METHODIK.

Wir haben zunächst den Einfluss der Imprägnierung auf die Laufzeit untersucht. Damit wollten wir versuchen, den zeitraubenden Prozess der Chromatographie abzukürzen. Es hat sich dabei gezeigt, dass schon nach 18 Stunden kein wesentlicher Fortschritt der Lösungsmittelfront mehr auftritt. Bei stark imprägnierten Papieren, d.h. solchen die 3-8-Stunden getrocknet wurden, lag die Höhe der Lösungsmittelfront zwischen 21-27 cm. Bei schwach imprägnierten Streifen (Trockendauer 30 Stunden und länger) erreichte die Lösungsmittelfront eine Höhe von 27-34 cm. Bei drei weitergehenden Versuchen von 25, 30 und 40 Stunden Laufzeit und starker Imprägnierung wurden Höhen von 26-31 cm erzielt.

Aus diesen Versuchsergebnissen ist ersichtlich, dass selbst beträchtliche Imprägnierungsunterschiede auf die Laufzeit keinen grösseren Einfluss ausüben. Die im Durchschnitt grösseren Höhen bei schwach imprägnierten Streifen lassen den Schluß zu, dass hier die Wanderungsgeschwindigkeit gegenüber dem stark imprägnierten Papier erhöht ist. Die Fortschritte der Lösungsmittelfront, die bei einer von 18 auf

40 Stunden erhöhten Laufzeit erreicht werden, betragen etwa 15%, die im Vergleich zum Zeitaufwand nicht ins Gewicht fallen. Die recht erheblichen Schwankungen in der Höhe der Lösungsmittelfront (bis zu 6 cm) bei Übereinstimmung von Imprägnierung, Lösungsmittel und Laufzeit sind wohl durch die unterschiedlichen Temperaturverhältnisse im Versuchsraum zu erklären, und zwar in dem Sinn, dass schon geringe Temperaturunterschiede von 4° - 6°C , wie sie bei uns auftraten, die Wanderungsgeschwindigkeit relativ stark beeinflussten.

VERSUCHE MIT REINEN SUBSTANZEN.

Die Trennung von Gemischen aus Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure gelang in den meisten Versuchen, ohne dass es zu einer Überlagerung oder Schwanzbildung kam. Gelegentlich war die Trennung ohne ersichtlichen Grund schlecht. Im allgemeinen liessen sich die Flecke in relativ konzentrierter Form und guter Abgrenzung anfärben. Der durchschnittliche Durchmesser war bei den auf der Startlinie aufgetragenen Gemischflecken 1,0 cm, bei den Flecken des Chromatogramms 1,4 cm; d. h. der Durchmesser der einzelnen aufgetrennten Flecken war nur um 40% grösser als der des aufgetragenen Startflecks. Bei schwacher Imprägnierung und langer Laufzeit vergrössert sich der Durchmesser erheblich, während er sich bei starker Imprägnierung und kürzerer Laufzeit nicht über die Ausdehnung des Startflecks hinaus vergrössert. Bei allen angestellten Versuchen konnte die Ölsäure von der Palmitinsäure nicht getrennt werden.

Die von uns errechneten Rf-Werte schwankten im Allgemeinen sehr stark und konnten nur in seltenen Fällen reproduziert werden, obwohl Imprägnierung, Laufzeit und Lösungsmittel annähernd übereinstimmten. Wir konnten feststellen, dass die Rf-Werte bei schwach imprägnierten Streifen sehr hoch waren und ziemlich dicht beieinanderlagen, d. h. die Rf-Differenz der einzelnen Fettsäureflecken untereinander lag bei 0,07 und darunter. Bei starker Imprägnierung und abgekürzter Laufzeit waren die Rf-Werte dementsprechend niedriger, die Rf-Differenz betrug aber ebenfalls mindestens 0,07.

Die für uns günstigste Auftrennung erreichten wir bei 18 Stunden Laufzeit und einer Trocknungsdauer des imprägnierten Streifens von ca. 6 Stunden. Die Rf-Differenz war hier von Stearin- zu Palmitinsäure mindestens 0,11 und von Palmitin- zu Myristinsäure mindestens 0,15; demgegenüber sinkt die Rf-Differenz bei sehr stark imprägniertem Papier (3 Stunden getrocknet) auf 0,10. Bei sehr langer Laufzeit (40 Stunden) wird die Differenz der Rf-Werte der einzelnen Fettsäuren zwar noch günstiger (0,18 - 0,23), dieser Vorteil wird aber durch die grössere Flächenausdehnung der Flecke wieder aufgehoben.

Bei der Suche nach Bedingungen für fixe Rf-Werte haben wir Parallelversuche an-

gesetzt und mussten feststellen, dass trotz identischer Imprägnierung, Lösungsmittel und Laufzeit - beide Streifen befanden sich im gleichen Gefäss - die Rf-Werte sich um 0,02 - 0,03 unterschieden, in einem Fall sogar um 0,04 - 0,06. In einem anderen Fall wurde die Chromatographie unter genau den gleichen Bedingungen in zwei verschiedenen Gefässen durchgeführt, hier lagen die Rf-Unterschiede zwischen 0,08 und 0,12. Die einzige variable Grösse bei diesen Parallelversuchen war die Wanderungsgeschwindigkeit; die Lösungsmittelfront war in der gleichen Zeiteinheit verschieden hoch gewandert und dementsprechend verhielten sich auch die Rf-Werte.

Wir glaubten diesen Versuchen entnehmen zu können, dass nur wenn Imprägnierung, Lösungsmittel und Wanderungsgeschwindigkeit übereinstimmen, sich auch die Rf-Werte einem fixen Punkt nähern. Bei relativ niedriger Wanderungsgeschwindigkeit erhalten wir höhere Rf-Werte und eine höhere Rf-Differenz zwischen den einzelnen Säureflecken; wird sie dagegen grösser, so sinken die Rf-Werte ab und die Rf-Differenz wird geringer.

Wanderungs- geschwindkt.	Stearins.	Rf-Werte	
		Palm. -S.	Myrist. -S.
1,61 cm/h	0,19	0,26	0,35
1,33 cm/h	0,23	0,36	0,54
1,16 cm/h	0,32	0,44	0,61

Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass nicht sosehr die Imprägnierung, das Lösungsmittel und die Laufzeit für die genaue Reproduktion der Rf-Werte verantwortlich sind, sondern im viel stärkeren Mass die von ihnen und anderen Faktoren abhängige Wanderungsgeschwindigkeit der Lösungsmittelfront. Man muss also, um zu exakten Werten zu kommen, alle Versuchsbedingungen, die für die Wanderungsgeschwindigkeit verantwortlich sind, konstant halten.

Da für unsere Arbeit genau reproduzierte Rf-Werte nicht ins Gewicht fielen und vor allem weil wir keine konstanten Temperaturen einhalten konnten, war es notwendig, bei jedem Versuch ein Testgemisch aus Stearin-, Palmitin- und Myristinsäure mitlaufen zu lassen.

Imprägnier. Papier x St. getr.	Lauf- zeit in Std.	Rf-Werte			Lauf- höhe in cm	Wanderungs- geschw. in cm/h
		Stear.	Palm.	Myrist.		
3	18	0,36	0,47	0,57	22	1,22
5	40	0,42	0,60	0,83	27	0,67
5,5	18	0,23	0,36	0,54	24	1,33
5,5	18	0,19	0,32	0,49	25	1,38
5,5	18	0,30	0,44	0,59	21	1,16
5,5	18	0,32	0,44	0,61	21	1,16
6	18	0,25	0,36	0,52	23,5	1,31
6,5	17	0,19	0,26	0,35	27,5	1,61
8	24	0,28	0,41	0,56	26	1,08
8	24	0,28	0,43	0,58	25	1,04
8	30	0,35	0,45	0,58	31	1,03
30	17	0,70	0,77	0,85	34	2,0
5 Tage	28	0,96	----	----	30	1,06

In der Tabelle sind die Rf-Werte und Wanderungsgeschwindigkeiten bei verschiedenen langer Imprägnierung und Laufzeit aufgeführt.

Anschliessende Versuche, bei denen wir mit 99% und 100% Essigsäure p.a. eine Auftrennung erreichen wollten, sind sämtlich fehlgeschlagen. Die Fettsäuren blieben hier zwar teilweise im Mittelfeld des Chromatogramms liegen, es traten aber Schwanzbildungen auf, die Flecke waren verzerrt und überlagert, so dass keine Identifizierung möglich war. Bei einem anderen Teil der Versuche traten grobe Streifenbildungen auf, die sich über das halbe Chromatogramm bis zur Lösungsmittelfront hin erstreckten. Wir mussten diesen Versuchen entnehmen, dass wir uns mit 96% Essigsäure im Grenzbereich der höchstmöglichen Konzentration des Lösungsmittels befanden.

VERSUCHE MIT TIERISCHEN FETTEXTRAKTEN.

Zum Abschluss unserer Versuchsreihe wurden als Testversuche die Fettsäuren aus Ratten- und Taubenleber aufgetrennt. Wir haben die Neutralfette extrahiert und verseift, die anfallende Fettsäuremenge wurde in Wiegeschälchen abgewogen und als 2-3% benzolische Lösung aufgetragen. Bei diesen Versuchen erwarteten wir nur Fettsäuren von C_{14} bis C_{18} , da die höheren und niederen Fettsäuren beim Tier im Vergleich zu den ersteren nicht ins Gewicht fallen. Der Hauptanteil musste aus Ölsäure bestehen, da Ölsäure den grössten Teil der Körperfette ausmacht.

Die Auftrennung gelang, entsprechend unseren Vorversuchen, auch hier einwandfrei. Palmitinsäure + Ölsäure war in jedem Fall als gut gefärbter Fleck deutlich sichtbar. Stearinsäure war schwach angefärbt und auf jedem Chromatogramm anwesend, während Myristinsäure, wahrscheinlich plus Palmitoleinsäure, nur in 2 von 10 Fällen angedeutet angefärbt war. Selbst nachdem die aufgetragene Fettsäuremenge verdoppelt wurde, konnten wir Myristinsäure + Palmitoleinsäure nicht sicher anfärben.

Stearins.	Rf- Werte Palm. -S.	Myrist. -S.	Wanderungs- geschw. in cm/h
0,27	0,36	0,51	1,33
0,26	0,38	0,54	1,25
0,33	0,44	0,60	1,16
0,33	0,44	0,61	1,19
0,31	0,42	0,58	1,20

Die Rf-Werte der dritten Spalte in der Tabelle wurden aus den Myristinsäureflecken des mitlaufenden Testgemisches errechnet.

VERSUCHE ZUR AUSWERTUNG.

Für unsere Versuche zur Auswertung verwendeten wir die Chromatogramme der vorhergegangenen Testversuche. Die darauf aufgetrennten Fettsäuren stammten ausschliesslich von Tieren, die im Laufe eines Stoffwechselversuchs radioaktives Tripalmitin erhalten hatten (19).

Das von uns gebrauchte radioaktive Tripalmitin stammte von "The Radiochemical Centre, Amersham (England)"; in dem Palmitat war das C1-Atom durch C₁₄ markiert.

Um die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Fettsäureflecke nachzuweisen, haben wir nacheinander drei Methoden untersucht.

1. Nachweis durch Autoradiographie:

Die Chromatogramme wurden auf Filmgrösse zugeschnitten und mit einem Röntgenfilm zusammengebracht, und zwar die Schichtseite des Films mit der Vorderseite des Chromatogramms. Dann wurden Papier und Film zwischen zwei Glasplatten gelegt, in schwarzes Papier eingeschlagen, mit einem Gewicht beschwert und so in einem lichtundurchlässigem Schrank für zwei Monate eingeschlossen. Die Dauer der Entwicklungszeit wurde bei diesen Filmen verdoppelt, bei einem Teil sogar verdreifacht.

Als Ergebnis fanden wir an der Stelle des Films, die dem Palmitinsäurefleck auf dem Chromatogramm entsprach, eine, wenn auch sehr schwache Schwärzung. An der Stelle der Myristin- und Stearinsäureflecke war keinerlei Schwärzung aufgetreten.

Die geringe Schwärzung liess sich nicht photometrisch auswerten, d.h. für eine Auswertung unserer Chromatogramme war die Methode der Autoradiographie zu wenig empfindlich.

2. Nachweis durch einen Radiopapierchromatographen:

Wir verwendeten hierfür den Radiopapierchromatograph FH 452 und den Zeitdrucker FH 449 der Firma "Friescke und Hoepfner", die beide mit dem Zählgerät FH 49 der gleichen Firma in Verbindung standen.

Das Chromatogramm wurde in 3 cm breite Streifen zerschnitten und zwischen zwei Glimmerfolien gelegt, um Verunreinigungen des Geräts auszuschliessen. Wir konnten bei diesen Versuchen selbst bei grösstmöglicher Empfindlichkeit des Zählgeräts keine messbare Radioaktivität registrieren.

Kontrollversuche ergaben auch bei Auswertung des Startflecks eines Chromato-

gramms, der 100 Gamma eines Fettsäuregemisches aus Rattenleber enthielt, keinerlei messbaren Ausschlag. Erst im Verlauf einer Kontrollmessung, bei der 200 und 300 Gamma des Fettextraktes auf einen Streifen aufgetragen und gemessen wurden, konnte eine Radioaktivität registriert werden.

3. Auswertung durch ein Methandurchflusszählrohr:

Für diese Versuche stand uns ein Methandurchflusszähler FH 49 der Firma "Friesekke und Hoepfner" zur Verfügung. Wir mussten zu diesem Zweck die Flecke des Chromatogramms ausschneiden und in die im Durchmesser 2,5 cm grossen Schälchen des Zählers einlegen. Die in unseren Versuchen erreichte Fleckgrösse der aufgetrennten Fettsäuren war flächenmässig in jedem Falle kleiner als die Grösse der Schälchen des Zählers. Dadurch waren wir in der Lage, die Einzelflecke im Gesamten auszuwerten, d. h. wir brauchten sie nicht zu teilen.

Unsere Messungen ergaben bei Untersuchung von Leberfetten für Palmitinsäure Werte von 180 - 240 Impulse pro Minute bei einem Nullwert von 7-10 Imp/min. Bei Stearinsäure schwankten die Werte zwischen 30 und 50 Imp/min. Da die Myristinsäure nicht angefärbt werden konnte, haben wir den ihr entsprechenden Fleck auf dem Papier ausgeschnitten und gemessen. Die Werte entsprachen hier meist dem Nullwert, lagen aber teilweise bis zu 5 Imp/min darüber.

Zur Kontrolle wurden die Streifen verschiedener Chromatogramme von der Startlinie bis zur Lösungsmittelfront in entsprechend grosse Stücke geschnitten, um sie im Zählrohr auswerten zu können. Die Messungen ergaben für alle Teilstücke, die frei von angefärbten Fettsäureflecken waren, keine Impulszahl, die über den Nullwert hinausging.

Die Versuche der dritten Auswertungsmethode haben gezeigt, dass sich die Radioaktivität in Palmitinsäure, wo sie bestimmt erwartet wurde, und in Stearinsäure sicher nachweisen lässt. Unsichere, jedenfalls geringe Aktivitäten wurden an der Stelle des Myristinsäureflecks gemessen. Weiter haben sie gezeigt, dass der restliche Teil des Chromatogramms frei von mit unseren Methoden messbarer Radioaktivität ist. Wir mussten aus diesen Ergebnissen den Schluss ziehen, dass für die Auswertung von papierchromatographisch aufgetrennten aktiven Fettsäuren wegen ihrer geringen Substanzmenge nur die dritte Methode empfindlich genug ist, um Aufschlüsse über die Verteilung der Radioaktivität zu geben.

DISKUSSION

Die vorgefundene Aktivität des Palmitinsäureflecks dürfte in erster Linie der Aktivität der zugeführten C-1-markierten Palmitinsäure entsprechen. Die Aktivität des Stearinsäureflecks zeigt darüber hinaus, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen auch eine Kettenverlängerung stattgefunden hat. Falls der Myristinsäurefleck tatsächlich Aktivität enthalten hat, dürfte diese auf einen Gehalt an Palmitoleinsäure zurückzuführen sein, da die Dehydrogenierung aktiver Palmitinsäure durch Fettsäuredehydrogenase zu aktiver Palmitoleinsäure führt, während die Kettenverkürzung aktiver Palmitinsäure durch die Mechanismen der β -Oxydation unter Abspaltung des markierten C-1-Atoms inaktive Myristinsäure entstehen liesse. Durch Zusammenwirkung von Kettenverlängerung zu Stearinsäure und anschließende Dehydrogenierung würde aktive Ölsäure entstehen, die in unseren Versuchen jedoch vom Palmitinsäurefleck nicht abgetrennt wurde und deren mögliche Entstehung somit nicht nachweisbar ist.

Herrn Privatdozent Dr. med. Nepomuk Zöllner möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, für die freundliche Beratung und für die Übernahme des Referates meinen Dank aussprechen.

Frau Dr. Dr. Vera von Brand danke ich für die Möglichkeit den experimentellen Teil der Arbeit in ihrem Labor durchzuführen, sowie für die tatkräftige Unterstützung und Beratung während der Arbeit.

LITERATURVERZEICHNIS

1. F. Brown u. P. Hall Nature, 166, 66, 1950
2. E.R. Hiscox u. Nature, 166, 522, 1950
N.J. Beridge
3. E.P. Kennedy u. Analyt. Chemistry, 23, 1033, 1951
H.A. Barker
4. R.L. Leid u. Biochemical Journal, 50, 60, 1951
M. Lederer
5. H.P. Kaufmann u. Fette und Seifen, 53, 390, 1951
Budwig
6. K. Satake u. T. Seki J. Japan Chemistry, 4, 557, 1950
7. F. Brown Biochemical Journal, 47, 598, 1950
8. Y. Inouye u. M. Noda J. agric. chem. 23, 294, 1950
soc. Japan, 24, 295, 1951
9. F. Michel u. Angewandte Chemie, 66, 136, 1954
H. Schweppe
10. Th. Wieland u. Angewandte Chemie, 64, 418, 1952
A. Berg
11. D. Kritchevsky u. Science, 114, 299, 1951
A. Tiselius
12. J. Boldingh Experientia, IV, 270, 1948
13. G. Nunez Thèse Sciences, Paris 1952
14. Wegmann, Ceccaldi Fette und Seifen, 56, 159, 1954
u. Biez
15. J. Spiteri Bull. soc. chim. biol., 36, 1355, 1954
16. A. Holasek u. Monatshefte Chemie, 85, 790, 1954
K. Winsauer
17. H.P. Kaufmann u. Fette und Seifen, 56, 154, 1954
W..Nitsch

18. H. Wagner, L. Abisch Helvet. chimica acta, 38/2, 1536, 1955
 u. K. Bernhard
19. V. v. Brand, Nutritio et Dieta, 1, 161, 1959
 H. Drescher u. (Basel)
 N. Zöllner

LEBENS LAUF

Am 7.12.1932 wurde ich, Klaus Vogelsang, als erster Sohn des praktischen Arztes Dr. med. Werner Vogelsang und seiner Ehefrau Anne-liese, geb. Schmincke, in Ulm-Söflingen (Württemberg) geboren.

Ab Ostern 1939 besuchte ich die Volksschule meines Geburtsortes. Von September 1943 bis Ende 1944 war ich Schüler des humanistischen Gymnasiums in Ulm, ab Herbst 1945 Schüler der privaten Oberreal-schule mit Internat in Illertissen, an der ich im Sommer 1952 die Reifeprüfung ablegte.

Vom Wintersemester 1952/53 bis zum Sommersemester 1955 studier-te ich an der Universität Tübingen Medizin und bestand dort im Früh-jahr 1955 meine ärztliche Vorprüfung. Nach zwei weiteren Semestern an der Universität Innsbruck ging ich zum Wintersemester 1956/57 an die Universität München; hier legte ich im Sommer 1958 mein Staats-examen ab.

Seither war ich als Medizinalassistent in der Medizinischen Poliklinik und an einer chirurgischen Privatklinik tätig.

